表皮生长因子对脂多糖刺激断奶仔猪肠道钠磷转运载体蛋白Ⅱb 表达的影响

汤小朋 徐 荣 李成良 彭 鹏 禹琪芳 方热军*

（湖南农业大学动物科学技术学院，湖南畜禽安全生产协同创新中心，长沙 410128）

摘 要：本试验旨在研究表皮生长因子（EGF）对脂多糖（LPS）刺激的应激状态下仔猪肠道钠磷转运载体蛋白Ⅱb（NaPi-Ⅱb）表达的影响。本试验由 2 部分组成，1）细胞试验：以猪小肠上皮细胞（IPEC-J2）为模型，试验设 4 个组，对照组（0 ng/mL EGF，0 μg/mL LPS）、EGF 组（100 ng/mL EGF，0 μg/mL LPS）、LPS 组（0 ng/mL EGF，1.0 μg/mL LPS）、EGF+LPS 组（100 ng/mL EGF，1.0 μg/mL LPS），每组 3 个重复；2）动物试验：选取 24 头体重接近、健康状况良好的 21 日龄“长白×大白”二元杂交断奶阉公猪[平均体重(5.76±0.38 kg）]，随机分为 4 个组，对照组（基础饲粮）、EGF 组（基础饲粮+2 mg/kg EGF）、LPS 组（基础饲粮+腹腔注射 100 μg/kg BW LPS）、EGF+LPS 组（基础饲粮+2 mg/kg EGF+腹腔注射 100 μg/kg BW LPS），每组 6 个重复，每个重复 1 头猪。结果表明：1）细胞试验中，与对照组相比，EGF 组 IPEC-J2 细胞 NaPi-Ⅱb mRNA 及蛋白表达显著下降（*P*<0.05），而 EGF+LPS 组细胞 NaPi-Ⅱb mRNA 及蛋白表达显著增加（*P*<0.05），EGF 与 LPS 免疫应激的互作效应对 NaPi-Ⅱb mRNA 及蛋白表达影响显著（*P*＜0.05）。2）动物试验中，各组间血清钙（Ca）含量无显著差异（*P*>0.05），LPS 组血清磷（P）含量显著高于对照组、EGF 组、EGF+LPS 组（*P*＜0.05），EGF 组血清碱性磷酸酶（ALP）活性显著高于 LPS 组（*P*＜0.05），EGF 与 LPS 免疫应激互作效应对血清 P 含量影响显著（*P*＜0.05），对血清 Ca 含量和 ALP 活性影响不显著（*P*>0.05）。与对照组相比，EGF 组空肠与回肠 *NaPi-Ⅱb* mRNA 表达显著下降（*P*<0.05），而 EGF+LPS 组空肠与回肠 *NaPi-Ⅱb* mRNA 表达显著增加（*P*<0.05），EGF 与 LPS 免疫应激互作效应对空肠与回肠 *NaPi-Ⅱb* mRNA 表达影响显著（*P*<0.05）。细胞与动物试验结果表明，EGF 对

收稿日期：2018-03-29

基金项目：湖南省自然基金面上项目（2018JJ2163）；国家自然科学基金面上项目（31572419）；湖南生研究生科研创新项目（CX2016B276）

作者简介：汤小朋(1986—)，男，湖南邵阳人，博士研究生，从事动物营养与饲料研究。E-mail: tangxiaopeng110@126.com

*通信作者：方热军，教授，博士生导师，E-mail: fangrj63@126.com

NaPi-Ⅱb 的表达起抑制作用，但在免疫应激状态下可促进 NaPi-Ⅱb 的表达，表明 EGF 可促进应激状态下肠道 P 的主动转运。

关键词：表皮生长因子；磷；NaPi-Ⅱb；脂多糖；猪小肠上皮细胞；断奶仔猪

中图分类号：S　　　　　文献标识码：　　　　　　　　　　　文章编号：

磷（P）是生物系统的重要组成部分，涉及到各种生理过程，包括能量代谢、细胞信号、核苷酸和磷脂生物合成以及牙齿、骨骼形成[1-2]。研究已证实钠磷转运载体蛋白Ⅱb（type Ⅱb sodium-phosphate cotransporter, NaPi-Ⅱb）是介导肠道磷主动转运的主要途径[3-4]。NaPi-Ⅱb 受许多因素的调节，表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）是调节其表达的重要因素之一[5-8]。EGF 是一种重要的生长因子，广泛存在于乳液、唾液、尿液、肠液、血液、羊水等体液中，对细胞生存、增殖与分化、迁移、凋亡等具有重要作用[9-11]。前人在人 Caco2 细胞及猪小肠上皮细胞（IPEC-J2）中的研究表明，EGF 可抑制细胞 NaPi-Ⅱb 的表达，说明在正常培养条件下，EGF 可能通过其他途径调节细胞对磷的吸收。理论上讲，在 EGF 对肠道屏障功能的修复过程中，必然伴随大量 DNA、RNA 和蛋白质的合成，其前提需要经肠道吸收更多的磷，此过程中所需更多的磷是通过何种途径满足机体需要还未见报道。因此，本研究通过细胞试验与动物试验相结合的方法，研究 EGF 对脂多糖（LPS）刺激的应激状态下断奶仔猪小肠磷吸收的影响，为进一步诠释 EGF 对磷的吸收提供新的认识。

1　材料与方法

1.1　细胞试验

1.1.1　主要试剂

EGF 购自 Peprotech 公司；LPS、Tris、十二烷基磺酸钠（SDS）、过硫酸铵（APS）、四甲基乙二胺（TEMED）、Tween-20、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、丽春红购自 Sigma 公司；胎牛血清（FBS）、胰蛋白酶、青链双抗购自 GIBCO 公司；DMEM/F12（HyClon）培养基购自 GE；CCK-8 试剂盒、BCA 蛋白试剂盒、磷酸缓冲液（PBS）、RIPA 蛋白裂解液购自索莱宝公司；TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司；逆转录试剂盒、UltraSYBR Mixture 及 DM 2000 Plus DNA Marker 均购自北京康维世纪公司；Super ECL Plus 超敏发光液购自 Thermo 公司；一抗 NaPi-Ⅱb（货号：21773-1-AP）、一抗β-actin（货号：60008-1-Ig）、二抗（Goat Anti-Rabbit IgG/HRP）购自 Proteintech 公司。

1.1.2　细胞培养及分组

IPEC-J2 细胞由中国科学院亚热带农业生态研究所提供。细胞经活化后，培养在含 10% FBS、1%青链双抗的培养基中，置于 37 ℃，含有 5% CO_2 的培养箱中培养。细胞生长至 80%~90%融合后，用 0.25%胰蛋白酶消化细胞，显微镜下计数，收集的细胞用于细胞传代或进行后续试验。试验设 4 个组：对照组（0 ng/mL EGF，0 μg/mL LPS）、EGF 组（100 ng/ mL EGF，0 μg/mL LPS）、LPS 组（0 ng/mL EGF，1.0 μg/mL LPS）、EGF+LPS 组（100 ng/mL EGF，1.0 μg/mL LPS），每组 3 个重复。EGF、LPS 剂量的选择及培养时间的确定参照文献[11]。将细胞以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中，每孔加入 2 mL 含 10% FBS、1%青链双抗的培养基，培养 24 h 后，弃去培养基，用 37 ℃ PBS 润洗 2 遍，然后分别加入相应剂量的 EGF 与 LPS，加入培养基至 2 mL，培养 24 h。

1.1.3　EGF 对 LPS 刺激的 IPEC-J2 细胞 *NaPi-*Ⅱ*b* mRNA 表达的测定

采用实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）检测细胞 *NaPi-*Ⅱ*b* mRNA 的表达。细胞培养结束后，用 PBS 洗涤细胞 2 次，每孔加入 Trizol 1 mL，按照 Trizol 试剂说明书提取总 RNA，并测定总 RNA 浓度及 1%琼脂凝胶检测 RNA 完整性。以细胞总 RNA 为模板，用逆转录试剂盒反转录为 cDNA，具体步骤参照试剂盒说明书。定量 PCR 反应按照荧光定量 PCR 检测试剂盒操作。所用引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。*NaPi-*Ⅱ*b* 引物序列为 F：GCCCGAGCTTAAGAACACA，R：CATGACACCAGCACCATCGTT；β-肌动蛋白（β-actin）引物序列为 F：CATCCTGCGTCTGGACCTGG，R：TAATGTCACGCACGATTTCC。实时荧光定量 PCR 程序参照 Tang[11]介绍的方法进行。以β-actin 基因为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行目的基因相对表达量计算。

1.1.4　EGF 对 LPS 刺激的 IPEC-J2 细胞 NaPi-Ⅱb 蛋白表达的测定

采用 Western blot 检测细胞 NaPi-Ⅱb 蛋白的表达。细胞培养结束后，弃去培养基，PBS 洗涤细胞 1 次，加入 250 μL RIPA 细胞裂解液（含 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂），冰上裂解 15 min，4 ℃，12 000 rpm 离心 3~5 min，取上清分装后置于-80 ℃冰箱保存，待测。蛋白浓度测定采用南京建成的 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定，具体参照说明书步骤进行。Western blot 程序参照 Tang 等[11]介绍的方法进行。

1.2　动物试验

1.2.1 试验材料

EGF 由长沙某公司提供，EGF 含量为 4 000 mg/kg；LPS（大肠杆菌血清型 O55：B5）、石蜡、中性树胶、伊红购自 sigma 公司；RT-PCR 所需试剂同 1.1.3。

1.2.2 试验动物及分组

选取 24 头体重接近、健康状况良好的 21 日龄“长白×大白”二元杂交断奶阉公猪[平均体重（5.76±0.38）kg]，随机分为 4 个组：对照组（基础饲粮）、EGF 组（基础饲粮+2 mg/kg EGF）、LPS 组（基础饲粮+腹腔注射 100 μg/kg BW LPS）、EGF+LPS 组（基础饲粮+2 mg/kg EGF+腹腔注射 100 μg/kg BW LPS），每组 6 个重复，每个重复 1 头猪，试验期 14 d。基础饲粮配制参照 NRC（2012）猪的营养需要，其组成及营养水平见表 1。在试验的第 8 天、第 15 天清晨，给 LPS 组和 EGF+LPS 组仔猪注射 100 μg/kg BW 的 LPS[12]，对照组和 EGF 组注射等量的生理盐水。

表 1 基础饲粮组成及营养水平（饲喂基础）

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet (as fed basis) %

原料 Ingredients	含量 Content	营养水平 Nutrient levels2)	含量 Content
玉米 Corn	63.70	消化能 DE/（MJ/kg）	14.22
压榨豆粕 Squeezed soybean meal	16.00	粗蛋白质 CP	19.59
膨化大豆 Expanded soybean	8.00	赖氨酸 Lys	1.33
鱼粉 Fish meal	4.50	蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	0.73
乳清粉 Whey powder	2.00	钙 Ca	0.86
葡萄糖 Glucose	2.00	总磷 Total P	0.74
石粉 Limestone	0.78	有效磷 Available P	0.45
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	1.30		
赖氨酸 Lys	0.35		
蛋氨酸 Met	0.07		
苏氨酸 Thr	0.06		
食盐 NaCl	0.24		

预混料 Premix[1)]	1.00
合计 Total	100.00

[1)] 预混料为每千克饲粮提供 The premix provided the following per kilogram of the diet：VA 10 000 IU；VD_3 1 500 IU；VE 60 mg；VK_3 3 mg；VB_1 1.8 mg；VB_{12} 0.024 mg；核黄素 riboflavin 6 mg；叶酸 folic acid 0.3 mg；生物素 biotin 4.5 mg；烟酸 nicotinic acid 24 mg；*D*-泛酸 *D*-pantothenic acid 15 m g；胆碱 choline 1 000 mg；Zn 125 mg；Fe 120 mg；Cu 150 mg；I 0.3 mg；Se 0.3 mg。

[2)]粗蛋白质、总磷、钙为实测值，其余为计算值。CP, total P, Ca levels were measured values, while others were calculated values.

1.2.3 饲养管理

本试验于 2017 年 11 月 12 日—2017 年 11 月 29 日在益阳兆丰农牧科技有限公司猪舍进行。试猪单栏饲养，试验期间自由采食与饮水。每天 08:00、12:00、16:00、20:00 投喂饲粮，第 2 天投喂前收集剩余饲粮。每天中午通风 15 min 左右，猪舍温度控制在 25~28 ℃，相对湿度 50%~70%。

1.2.4 样品采集

血样：试猪在试验的第 15 天，注射 LPS 6 h 后，采集前腔静脉血 10 mL。血液样品在 4 ℃，3 500 r/min 离心 10 min，收集血清，-20 ℃保存。

黏膜样：试猪在试验的第 15 天，注射 LPS 6 h 后，全部仔猪注射 50 mg/kg BW 的戊巴比妥钠，待完全麻醉后屠宰，屠宰后迅速从胸骨到耻骨切线打开腹腔，取出胃肠道，于空肠、回肠处分别采集 1 段约 5 cm 肠段，用 4 ℃预冷 1×PBS 轻轻漂洗，于冰面上刮取黏膜，分装 2 管，液氮速冻后于-80 ℃保存。

1.2.5 EGF 对 LPS 刺激的断奶仔猪血清钙、磷含量的测定

血清钙含量的测定采用南京建成生物工程研究所生产的钙测试盒（微板法，货号 C004-2）测定。血清磷含量的测定采用南京建成生物工程研究所生产的磷测试盒（磷钼酸法，货号 C006）。测定步骤参照相应的试剂盒说明书进行。

1.2.6 EGF 对 LPS 刺激的断奶仔猪血清碱性磷酸酶活性的测定

血清碱性磷酸酶（ALP）活性采用迈瑞全自动生化分析仪 BS-200（深圳迈瑞医疗电子

股份有限公司）检测。试剂盒购自深圳迈瑞公司，测定步骤参照说明书进行。

1.2.7 肠黏膜 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 表达的测定

采用 qRT-PCR 法测定空肠、回肠肠黏膜 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 的表达情况。具体操作同 1.1.3。

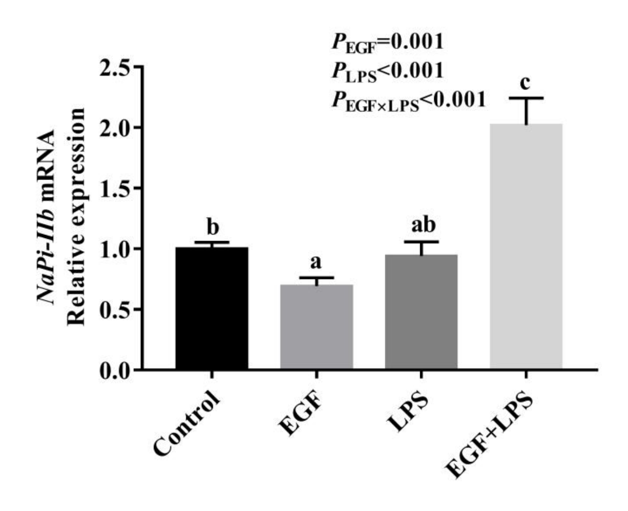
1.3 统计分析

试验结果以“平均值±标准差”（means±SD）表示，采用 SPSS 21.0 统计软件的 GLM 模型进行两因素方差分析，模型主效应包括 EGF 处理、LPS 处理以及两者的互作，one-way ANOVA 程序进行单因素方差分析，组间差异采用 Duncan 氏法进行多重比较，以 $P<0.05$ 作为差异显著性判断标准。

2 结果与分析

2.1 EGF 对 LPS 刺激的 IPEC-J2 细胞 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 表达的影响

由图 1 可知，与对照组相比，EGF 组细胞 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 表达显著下降（$P<0.05$），EGF+LPS 组细胞 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 表达显著提高（$P<0.05$）。与 EGF 组相比，EGF+LPS 组细胞 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 表达显著提高（$P<0.05$）。与 LPS 组相比，EGF+LPS 组细胞 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 表达显著提高（$P<0.05$）。EGF 与 LPS 免疫应激的互作效应对 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 表达影响显著（$P<0.05$）。结果表明，EGF 抑制细胞 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 的表达，但在应激状态下 EGF 促进细胞 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 的表达。



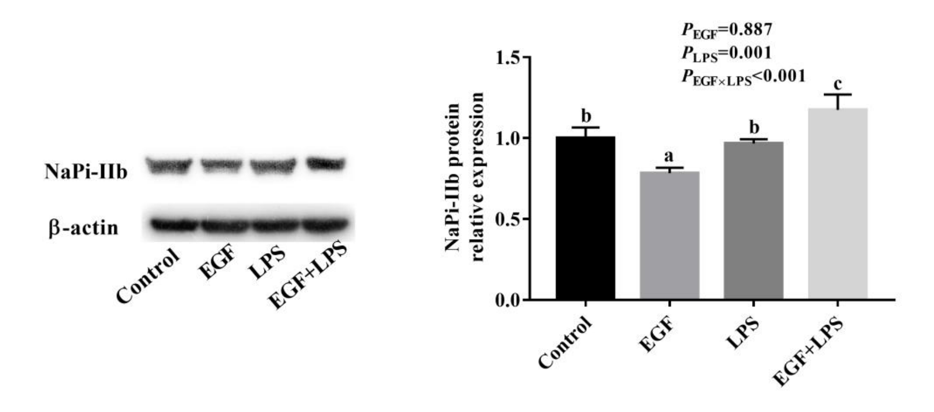
不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)，相同字母表示差异不显著($P>0.05$)，图 2、图 3 同。Values with different small letters mean significant difference ($P<0.05$), while with the same letter mean no significant difference ($P>0.05$). The same as Fig. 2 and Fig. 3.

图 1 EGF 对 LPS 刺激的 IPEC-J2 细胞 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 表达的影响

Fig. 1 Effects of EGF on *NaPi-* Ⅱ*b* mRNA expression in IPEC-J2 cells challenged by LPS

2.2 EGF 对 LPS 刺激的 IPEC-J2 细胞 NaPi-Ⅱb 蛋白表达的影响

由图 2 可知，与对照组相比，EGF 组细胞 NaPi-Ⅱb 蛋白表达显著下降（$P<0.05$），EGF+LPS 组细胞 NaPi-Ⅱb 蛋白表达显著提高（$P<0.05$）。与 EGF 组相比，EGF+LPS 组细胞 NaPi-Ⅱb 蛋白表达显著提高（$P<0.05$）。与 LPS 组相比，EGF+LPS 组细胞 NaPi-Ⅱb 蛋白表达显著提高（$P<0.05$）。EGF 与 LPS 免疫应激的互作效应对 NaPi-Ⅱb 蛋白表达影响显著（$P<0.05$）。Western blot 结果同样表明，EGF 抑制细胞 NaPi-Ⅱb 蛋白表达，但在应激状态下 EGF 促进细胞 NaPi-Ⅱb 蛋白的表达。



A: Western blot 电泳图；B：NaPi-Ⅱb 蛋白表达量。

A: Western blot electrophoretogram; NaPi-Ⅱb protein expression level.

图 2 EGF 对 LPS 诱导的 IPEC-J2 细胞 NaPi-Ⅱb 蛋白表达影响

Fig. 2 Effects of EGF on NaPi-Ⅱb protein expression in IPEC-J2 cells challenged by LPS

2.3 EGF 对 LPS 刺激的断奶仔猪血清钙、磷含量和碱性磷酸酶活性的影响

由表 2 可知，各组间血清钙含量无显著差异（$P>0.05$）；EGF 与 LPS 免疫应激互作效应对血清钙含量无显著影响（$P>0.05$）。LPS 组血清磷含量显著高于对照组、EGF 组、EGF+LPS 组（$P<0.05$），且 EGF 与 LPS 免疫应激互作效应对血清磷含量影响显著（$P<0.05$）；EGF 组血清 ALP 活性显著高于 LPS 组（$P<0.05$），与对照组、EGF+LPS 组差异不显著（$P>0.05$），EGF 与 LPS 免疫应激互作效应对血清 ALP 活性无显著影响（$P>0.05$）。

表 2 EGF 对 LPS 刺激的断奶仔猪血清钙、磷含量和碱性磷酸酶含量的影响

Table 2 Effects of EGF on serum Ca, P contents and ALP activity of weaned piglets challenged

by LPS

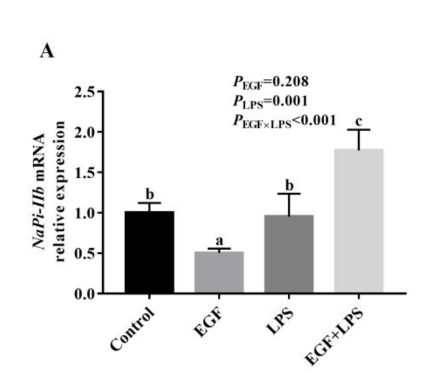
项目 Items	对照组 Control group	EGF 组 EGF group	LPS 组 LPS group	EGF+LPS 组 EGF+LPS group	*P* 值 *P*-value		
					EGF	LPS	EGF×LPS
碱性磷酸酶 ALP/(U/L)	322.48±31.90[ab]	375.93±32.49[b]	285.59±66.01[a]	367.64±60.67[ab]	0.034	0.427	0.611
钙 Ca/(mmol/L)	1.42±0.03	1.35±0.09	1.42±0.03	1.39±0.06	0.056	0.571	0.461
磷 P/(mmol/L)	2.67±0.51[a]	2.81±0.53[a]	4.28±0.44[b]	2.82±0.49[a]	0.008	0.002	0.003

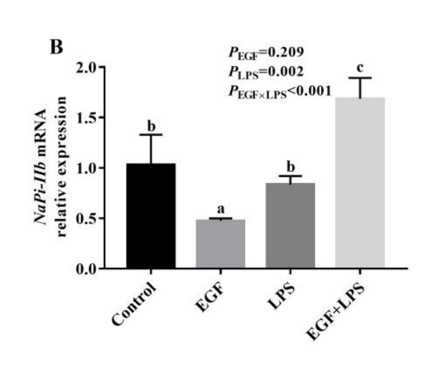
同行数据肩标不同小写字母表示差异显著(P<0.05)，相同字母或无字母表示差异不显著(P>0.05)。

Values with different small letter superscripts mean significant difference (P＜0.05), while with the same letter superscripts mean no significant difference (P＞0.05).

2.4 EGF 对 LPS 刺激的断奶仔猪小肠黏膜 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 表达的影响

由图 3 可知，与对照组相比，EGF 组空肠（图 3A）、回肠（图 3B）黏膜 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 的表达均显著降低（P＜0.05），EGF+LPS 组空肠（图 3A）、回肠（图 3B）黏膜 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 的表达均显著增加（P＜0.05）。与 LPS 组相比，EGF 组空肠（图 3A）、回肠（图 3B）黏膜 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 的表达均显著降低（P＜0.05），EGF+LPS 组空肠（图 3A）、回肠（图 3B）黏膜 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 的表达均显著增加（P＜0.05）。与 EGF 组相比，EGF+LPS 组空肠（图 3A）、回肠（图 3B）黏膜 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 的表达均显著增加（P＜0.05）。EGF 与 LPS 免疫应激互作效应对空肠与回肠 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 的表达影响显著（P＜0.05）。动物试验结果表明，EGF 抑制小肠黏膜 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 表达，但在应激状态下促进小肠黏膜 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 表达。





A：空肠 *NaPi-*Ⅱ*b* mRNA 相对表达量；B：回肠 *NaPi-*Ⅱ*b* mRNA 相对表达量。

A: *NaPi-IIb* mRNA relative expression in the jejunum; B: *NaPi-IIb* mRNA relative expression in the ileum.

图 3　EGF 对 LPS 刺激的断奶仔猪小肠黏膜 *NaPi-IIb* mRNA 表达影响

Fig. 3　Effects of EGF on *NaPi-*Ⅱ*b* mRNA expression in small intestinal mucosa of weaned piglets challenged by LPS

3　讨　论

磷是动物必需的矿物质元素之一，在动物生长发育、骨骼形成、能量代谢、核酸合成、细胞信号转导以及维持血液酸碱平衡中起着重要作用[1,3,13]。血清碱性磷酸酶是反映动物机体钙磷代谢状况的血清生化指标，当机体缺乏钙磷时，碱性磷酸酶释放增加。本研究结果表明，EGF 对 LPS 刺激的仔猪血清钙含量无显著影响，但对血清磷含量影响显著。EGF 组血清 ALP 活性显著高于 LPS 组，但饲粮 EGF 与 LPS 免疫应激互作效应对血清碱性磷酸酶活性无显著影响。LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁破裂后释放的毒性物质，是导致急性肾损伤的主要因素之一[14]。本研究中 LPS 组血清磷含量显著高于其他组，可能是 LPS 刺激导致了仔猪肾脏功能损伤，影响肾脏对磷的重吸收，从而导致血清磷含量异常升高。

肠道磷的吸收主要有被动扩散和主动吸收 2 种方式，NaPi-Ⅱb 是调节肠道磷主动转运的主要载体[3-5]，介导机体 70%～90%磷的主动转运[15-16]。NaPi-Ⅱb 的调控受许多因素的影响，如磷[1]、维生素 D_3[17]，雌二醇[2]、神经肽 Y[4]、降钙素基因相关肽、EGF[5-8]等。EGF 是一种含有 53 个氨基酸残基的小肽，其生物学功能的发挥是通过与其表皮生长因子受体（EGFR）结合后实现的[9]。EGFR 广泛存在于小肠刷状缘顶端及基底侧，当动物摄取的 EGF 递送到小肠黏膜后与 EGFR 结合，形成二聚物，激活酪氨酸激酶（RTK）活性，促进 RTK

自我磷酸化，随后激活 Ras/丝裂原活化蛋白激酶（Ras/MAPK）、磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B（PI3K/AKT）、磷脂酶 C-γ/蛋白激酶 C（PLC-γ/PKC）等一系列的信号通路，对细胞生存、增殖与分化、迁移、凋亡等具有重要作用[9-11,18]。前人在人 Caco2 细胞中的研究表明，EGF 通过修饰 c-myb 蛋白，经蛋白激酶 C/蛋白激酶 A（PKC/PKA）和 MAPK 信号通路调节下游启动子功能，从而抑制细胞 NaPi-Ⅱb 的转录活性，降低其表达量[5-6]。本课题组在猪 IPEC-J2 细胞中同样发现 EGF 抑制了细胞中 NaPi-Ⅱb 的表达，进一步研究发现 EGF 作用 NaPi-Ⅱb 启动子区域位于-1 092～-1 085 bp 区域（5′-TCCAGTTG-3′），且 EGF 通过激活 EGFR、PKA、PKC、P38、细胞外信号调节激酶（ERK）、氨基末端激酶（JNK）等信号分子来下调 IPEC-J2 细胞中 NaPi-Ⅱb 的表达[7-8]。Tang 等[11]研究表明，一定浓度的 EGF 可促进 IPEC-J2 细胞增殖，而细胞增殖过程中需要大量的磷用来合成 RNA 及 DNA，说明 EGF 可促进磷的吸收，但不是通过 NaPi-Ⅱb 介导的磷的主动吸收，可能存在其他途径介导磷的吸收。

应激是动物生产过程中的普遍现象，可导致动物肠道损伤，影响生产成绩。LPS 对小肠上皮细胞具有毒害作用，能刺激猪小肠上皮细胞分泌大量白介素（IL）-1β、IL-6、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）等促炎细胞因子，最终导致炎症的发生[19-21]。Tang 等[11]研究表明，LPS 刺激诱导了细胞氧化应激及细胞凋亡的发生，而 EGF 可通过缓解氧化应激减少细胞凋亡来保护 LPS 刺激的肠上皮细胞损伤。理论上讲，在 EGF 对受损肠细胞修复过程中，必然伴随大量 DNA、RNA 和蛋白质的合成，其前提需要经肠道吸收更多的磷，此过程中 EGF 是否解除对 NaPi-Ⅱb 表达的抑制作用，从而促进磷的主动吸收，以满足机体对磷的需要，还未见报道。因此，本研究采用细胞试验与动物试验相结合的方法研究 EGF 对应激状态下（LPS 刺激）猪小肠磷吸收的影响，结果表明，EGF 抑制 IPEC-J2 细胞的 NaPi-Ⅱb mRNA 及蛋白的表达，抑制仔猪空肠与回肠黏膜 *NaPi-*Ⅱ*b* mRNA 的表达，这与 Xu 等[4-5]、Xing 等[6]、邢廷杰等[7]研究结果一致，而 EGF 可促进 LPS 刺激的 IPEC-J2 细胞 NaPi-Ⅱb mRNA 及蛋白的表达，促进 LPS 刺激的断奶仔猪空肠与回肠黏膜 *NaPi-*Ⅱ*b* mRNA 的表达，说明在非应激状态下 EGF 抑制 NaPi-Ⅱb 介导的磷的主动转运，在应激状态下，EGF 可解除对 NaPi-Ⅱb 的抑制，调控 NaPi-Ⅱb 介导的磷的主动吸收，以满足机体对磷的需要，加快肠道修复进程。前人研究表明，EGF 对断奶仔猪的生长及肠道发育具有促进作用[22-23]，说明 EGF 是促进磷吸

收，但不是通过 NaPi-Ⅱb 介导的磷的主动吸收。机体磷稳态的维持是通过肠道磷吸收与肾脏磷重吸收实现的[24]。肠道磷吸收有被动扩散和主动转运，除了 NaPi-Ⅱb 介导的主动转运，Ⅲ型钠离子依赖转运载体蛋白（type Ⅲ transporters PiT1 and PiT2）也能介导部分磷的主动吸收[25]，肾脏重吸收主要由 NaPi-Ⅱa 与 NaPi-Ⅱc 2 种蛋白介导，当肠道磷吸收不足时，肾脏磷重吸收加强，从而满足机体磷的需要[26]。因此，本研究中 EGF 可能通过增强肠道磷的被动扩散吸收，或通过增强 PiT1 和 PiT2 介导的磷主动转运，或通过加强肾脏重吸收满足机体磷的需要，但具体通过何种途径调节磷的吸收还需进一步的研究。应激条件下 EGF 如何解除对 NaPi-Ⅱb 的抑制，从而介导磷的主动转运以满足机体需求还需进一步的研究。

4 结 论

EGF 对肠道 NaPi-Ⅱb 的表达起抑制作用，但在免疫应激状态下可促进 NaPi-Ⅱb 的表达，其具体调节机制还有待进一步研究。

参考文献：

[1] FANG R J,XIANG Z F,CAO M H,et al.Different phosphate transport in the duodenum and jejunum of chicken response to dietary phosphate adaptation[J].Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,2012,25(10):1457–1465.

[2] FANG R J,XIANG Z F,HU L C,et al.Effects of mechanistic target of rapamycin signaling pathway on the estrogen-mediated NaPi-Ⅱb protein expression in pig small intestinal epithelial cells[J].Journal of Animal Science,2016,94(Suppl.3):303–306.

[3] XIANG Z,FANG R J,HU L C,et al.Molecular cloning and functional characterization of swine sodium dependent phosphate cotransporter type Ⅱb (NaPi-Ⅱb) gene[J].Molecular Biology Reports,2012,39(12):10557–10564.

[4] 胡龙昌,方热军.神经肽 Y 对猪小肠上皮细胞 NaPi-Ⅱb 蛋白表达及无机磷吸收的影响[J].畜牧兽医学报,2014,45(10):1640–1647.

[5] XU H,COLLINS J F,BAI L Q,et al.Regulation of the human sodium-phosphate cotransporter NaPi-Ⅱb gene promoter by epidermal growth factor[J].American Journal of Physiology Cell Physiology,2001,280(3):C628–C636.

[6] XU H,INOUYE M,HINES E R,et al.Transcriptional regulation of the human NaP_i-Ⅱb

cotransporter by EGF in Caco-2 cells involves c-myb[J].American Journal of Physiology Cell Physiology,2003,284(5):C1262–C1271.

[7] XING T,TAN X,YU Q,et al.Identifying the location of epidermal growth factor-responsive element involved in the regulation of type Ⅱb sodium-phosphate cotransporter expression in porcine intestinal epithelial cells[J].Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition,2017,101(6):1249–1258.

[8] 邢廷杰,汤小朋,曹满湖,等.表皮生长因子调控猪肠上皮细胞中钠依赖Ⅱb 型磷转运蛋白表达的细胞信号通路研究[J].动物营养学报,2017,29(6):1988–1955.

[9] TANG X P,LIU H,YANG S F,et al.Epidermal growth factor and intestinal barrier function[J].Mediators of Inflammation,2016,2016:1927348.

[10] 汤小朋,刘虎,杨淑芬,等.表皮生长因子在动物肠道无机离子及其他营养物质吸收中的作用[J].动物营养学报,2016,28(8):2317–2323.

[11] TANG X P,LIU B,WANG X R,et al.Epidermal growth factor,through alleviating oxidative stress,protect IPEC-J2 cells from lipopolysaccharides-induced apoptosis[J].International Journal of Molecular Sciences,2018,19(3):848.

[12] 张伟,杨震国,侯永清,等.N-乙酰半胱氨酸对脂多糖刺激仔猪空肠黏膜抗氧化能力的影响[J].动物营养学报,2011,23(5):842–847.

[13] WAGNER C A,HERNANDO N,FORSTER IC,et al.The SLC34 family of sodium-dependent phosphate transporters[J].Pflügers Archiv-European Journal of Physiology,2014,466(1):139–153.

[14]丁仁彧,肇冬梅,胡紫薇,等.Rho 激酶抑制剂通过抑制 Toll 样受体 4 和核因子 κ 核信号通路缓解脂多糖诱导的肾损伤[J].中国医科大学学报,2018,47(1):1–5.

[15] SABBAGH Y,O'BRIEN S P,SONG W P,et al.Intestinal Npt2b plays a major role in phosphate absorption and homeostasis[J].Journal of the American Society of Nephrology,2009,20(11):2348–2358.

[16] WONG S H,GAO A,WARD S,et al.Development of a label-free assay for sodium-dependent phosphate transporter NaPi- Ⅱ b[J].Journal of the American Society of

Nephrology,2012,17(6):829–834.

[17] 曹满湖,贺建华,方热军,等.低磷条件下 VD_3 对大鼠小肠 *NaPi*-Ⅱ*b* mRNA 表达及磷吸收的调控[J].中国农业科学,2010,43(18):3838–3847.

[18] WEE P,SHI H P,JIANG J,et al.EGF stimulates the activation of EGF receptors and the selective activation of major signaling pathways during mitosis[J].Cell Signal,2015,27(3):638–651.

[19] PASZTI-GERE E,MATIS G,FARKAS O,et al.The effects of intestinal LPS exposure on inflammatory responses in a porcine enterohepatic co-culture system[J].Inflammation,2014,37(1):247–260.

[20] YANG F J,WANG A N,ZENG X F,et al.*Lactobacillus reuteri* I5007 modulates tight junction protein expression in IPEC-J2 cells with LPS stimulation and in newborn piglets under normal conditions[J].BMC Microbiology,2015,15:32.

[21] 王雄,李孟伟,马杰,等.牛膝多糖对仔猪肠上皮细胞免疫应激的调控及其作用机制[J].动物营养学报,2017,29(11):4116–4122.

[22] BEDFORD A,CHEN T,HUYNH E,et al.Epidermal growth factor containing culture supernatant enhances intestine development of early-weaned pigs *in vivo*:potential mechanisms involved[J].Journal of Biotechnology,2015,196–197:9–19.

[23] WANG S J,GUO C H,ZHOU L,et al.Comparison of the biological activities of *Saccharomyces cerevisiae*-expressed intracellular EGF,extracellular EGF,and tagged EGF in early-weaned pigs[J].Applied Microbiology and Biotechnology,2015,99(17):7125–7135.

[24] MANGHAT P,SODI R,SWAMINATHAN R.Phosphate homeostasis and disorders[J].Annals of Clinical Biochemistry,2014,51(6):631–656.

[25] SABBAGH Y,GIRAL H,CALDAS Y,et al.Intestinal phosphate transport[J].Advances in Chronic Kidney Disease,2011,18(2):85–90.

[26] WAGNER C A,BIBER J,MURER H.Of men and mice:who is in control of renal phosphate reabsorption?[J].Journal of the American Society of Nephrology,2008,19(9):1625–1626.

Effects of Epidermal Growth Factor on Intestinal Type Ⅱb Sodium-Phosphate Cotransporter Expression of Weaned Piglets Challenged by Lipopolysaccharide

TANG Xiaopeng XU Rong LI Chengliang PENG peng YU Qifang FANG Rejun*

(*College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Hunan Co-Innovation Center of Animal Production Safety Changsha* 410128*, China*)

Abstract: The aim of this experiment was to study the effects of epidermal growth factor (EGF) on intestinal type Ⅱb sodium-phosphate cotransporter (NaPi-Ⅱb) expression of weaned piglets under stress condition challenged by lipopolysaccharide (LPS). The study was consisted of two parts, 1) cell experiment: intestinal porcine intestinal epithelial cells (IPEC-J2) were as the experimental model, and divided into 4 groups with 3 replicates in each, control group (0 ng/mL EGF, 0 μg/mL LPS), EGF group (100 ng/mL EGF, 0 μg/mL LPS), LPS group (0 ng/mL EGF, 1.0 μg/mL LPS), EGF+LPS group (100 ng/mL EGF, 1.0 μg/mL LPS); 2) animal experiment: twenty-four 21-day-old healthy weaned piglets (Large White×Landrace) with an average body weight of (5.76±0.38) kg were randomly divided into 4 groups, control group (basal diet), EGF group (basal diet+2.0 mg/kg EGF), LPS group (basal diet+intraperitoneal injection of 100 mg/kg LPS), EGF+LPS group (basal diet+2.0 mg/kg EGF+intraperitoneal injection of 100 mg/kg LPS), with 6 replicates per group and 1 piglet in each replicate. The results showed as follows: 1) in the cell experiment, compared with the control group, the expression of NaPi-Ⅱb mRNA and protein in IPEC-J2 cells significantly decreased in EGF group ($P<0.05$), whereas, that in IPEC-J2 cells significantly increased in EGF+LPS group ($P<0.05$), and there was a significant interaction between EGF and LPS immunological stress on the expression of NaPi-Ⅱb mRNA and protein ($P<0.05$); 2) in the animal experiment, there was no significant difference in serum Ca content among all groups （$P>0.05$）, serum P content in LPS group was significantly higher than that in control group, EGF group, and EGF+LPS group ($P<0.05$), alkaline phosphatase (ALP) activity in EGF group was significantly higher than that in LPS group ($P<0.05$), there was a significant interaction between EGF and LPS immunological stress on serum P content ($P<0.05$), but not on

---

* Corresponding author, professor, E-mail: fangrj63@126.com （责任编辑 陈 鑫）

Ca content and ALP activity（$P>0.05$）. Compared with the control group, the expression of *NaPi-Ⅱb* mRNA in the jejunum and ileum in EGF group was significantly decreased ($P<0.05$), while, that in EGF+LPS group was significantly increased ($P<0.05$), and there was a significant interaction between EGF and LPS immunological stress on the expression of *NaPi-Ⅱb* mRNA in the jejunum and ileum ($P<0.05$). The results of the cell experiment and animal experiment show that the EGF can inhibit the NaPi-Ⅱb expression, but can improve NaPi-Ⅱb expression under immunological stress condition, which indicate that EGF can promote the active absorption of P.

Key words: epidermal growth factor; phosphorus; NaPi-Ⅱb; lipopolysaccharide; porcine intestinal epithelial cells; weaned piglets